

COPY OF PAPERS,  
ORIGINALLY FILED

1611  
#

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
(Case No. 01-1701)

PATENT

In the Application of:

Hälg, *et al.*

Serial No. 09/992,313

Filed: November 19, 2001

For: Method and Device for Determining the  
Volume of a Liquid Sample

Before the Examiner:

Group Art Unit: 1614

Confirmation No.: 7362

6  
B/H  
8/15/82

TRANSMITTAL LETTER

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

RECEIVED

FEB 20 2002

TECH CENTER 1600/2900

Dear Sir:

In regard to the above identified application,

1. We are transmitting herewith the attached:

- a) Priority Claim
- b) Certified copy of Swiss Patent Application No. 2000 2252/00
- c) Certified copy of Swiss Patent Application No. 2000 2281/00
- d) Return Receipt Postcard

2. With respect to fees:

- a) No fee is required.

3. CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 CFR § 1.8: The undersigned hereby certifies that this Transmittal Letter and the paper, as described in paragraph 1, are being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on **January 3, 2002**.

RECEIVED  
FEB 20 2002  
TECHNOLOGY CENTER 2800

Respectfully submitted,

Date: January 3, 2002

Kevin E. Noonan  
Registration No. 35,303

RECEIVED  
AUG 15 2002  
TC 1700

FEB 13 2002

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**  
(Case No. 01-1701)

**PATENT**

In the Application of:

Hälg, *et al.*

Serial No. 09/992,313

Filed: November 19, 2001

For: Method and Device for Determining the  
Volume of a Liquid Sample

Before the Examiner:

Group Art Unit: 1614

Confirmation No.: 7362

**CLAIM OF PRIORITY**

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

Applicant(s) in the above-identified application, through the undersigned attorney, hereby requests that the above-identified application be treated as entitled to the right accorded by Title 35, U.S. Code, Section 119, having regard to the applications, which particulars are set out below:

In Switzerland, Application No. 2000 2252/00, filed November 17, 2000

In Switzerland, Application No. 2000 2281/00, filed November 23, 2000

Certified copies of the priority documents are enclosed.

Date: January 3, 2002

**RECEIVED**  
AUG 15 2002  
TC 1700

Respectfully submitted,

Kevin E. Noonan  
Reg. No. 35,303

RECEIVED  
FEB 26 2002  
TECHNOLOGY CENTER 2800



**SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
CONFÉDÉRATION SUISSE  
CONFEDERAZIONE SVIZZERA**

**Bescheinigung**

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

**Attestation**

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

**Attestazione**

I documenti allegati sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Bern, 23. OKT. 2001

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum  
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle  
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Patentverfahren  
Administration des brevets  
Amministrazione dei brevetti

  
Rolf Hofstetter



Patentgesuch Nr. 2000 2281/00

HINTERLEGUNGSBESCHEINIGUNG (Art. 46 Abs. 5 PatV)

Das Eidgenössische Institut für Geistiges Eigentum bescheinigt den Eingang des unten näher bezeichneten schweizerischen Patentgesuches.

Titel:

Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung des Volumes einer Flüssigkeitsprobe.

Patentbewerber:

Tecan Schweiz AG  
Feldbachstrasse 80  
8634 Hombrechtikon

Vertreter:

R. A. Egli & Co. Patentanwälte  
Horneggstrasse 4  
8008 Zürich

Anmeldedatum: 23.11.2000

Prioritäten:

CH 2252/00 17.11.2000

Voraussichtliche Klassen: G01N

Uebertragen an:

Tecan Trading AG  
Haldenstrasse 5  
6342 Baar

Vertreteränderung:

OK pat AG  
Patente Marken Lizenzen  
Chamerstrasse 50  
6300 Zug

reg: 27. September 2001

---



## Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung des Volumens einer Flüssigkeitsprobe

- 5 Die Erfindung betrifft - gemäss dem Oberbegriff des unabhängigen Anspruchs 1 - ein Verfahren zur Bestimmung des Volumens einer Probe einer Flüssigkeit (A), bei dem - zum Anfärben der Flüssigkeit (A) - eine bestimmte Konzentration eines chromophoren Indikators in dieser Flüssigkeit (A) erstellt,
- 10 eine Probe von der Flüssigkeit (A) abgetrennt, die optische Absorption der abgetrennten Probe gemessen und das Volumen der abgetrennten Probe durch Korrelation der gemessenen optischen Absorption mit der Konzentration des Indikators in dieser Flüssigkeit (A) bestimmt wird.
- 15 Es ist bekannt, dass Tropfen mit einem Volumen von mehr als 10  $\mu$ l sehr einfach aus der Luft abgegeben werden können, weil die Tropfen bei korrektem Umgang mit der Pipette von selbst die Pipettenspitze verlassen. Die Tropfengrösse wird
- 20 dann durch die physikalischen Eigenschaften der Probenflüssigkeit, wie Oberflächenspannung oder Viskosität bestimmt. Die Tropfengrösse limitiert somit die Auflösung der abzugebenden Menge Flüssigkeit. Die Aufnahme und Abgabe, d.h. das Pipettieren von Flüssigkeitsproben mit einem Volumen von we-
- 25 niger als 10  $\mu$ l verlangt dagegen meist Instrumente und Techniken, welche die Abgabe solch kleiner Proben garantieren.
- Das Abgeben einer Flüssigkeit mit einer Pipettenspitze, d.h. mit dem Endstück einer Vorrichtung zur Abgabe bzw. Aufnahme/Abgabe von Flüssigkeitsproben kann aus der Luft ("from Air") oder über das Berühren einer Oberfläche geschehen. Diese Oberfläche kann die feste Oberfläche eines Gefässes ("on Tip Touch") sein, in welches die Flüssigkeitsprobe abgegeben werden soll. Es kann auch die Oberfläche einer sich
- 35 in diesem Gefäss befindlichen Flüssigkeit ("on Liquid Surface") sein. Ein an das Dispensieren anschliessender Misch-

vorgang ist - besonders bei sehr kleinen Probenvolumina im Nano- oder gar Picoliter-Bereich - zu empfehlen, damit eine gleichmässige Verteilung des Probenvolumens in einem Diluent gewährleistet ist.

- 5 Systeme zum Abtrennen von Proben aus einer Flüssigkeit sind als Pipettierautomaten bekannt. Solche Systeme dienen z.B. zur Abgabe von Flüssigkeiten in die Aufnahmetöpfchen von Standard-Mikrotiterplatten™ (Handelsmarke von Beckman Coul-
- 10 ter, Inc., 4300 N. Harbour Blvd., P.O.Box 3100 Fullerton, CA, USA 92834) bzw. Mikroplatten mit 96 Töpfchen. Die Reduktion der Probenvolumina (z.B. zum Befüllen von hochdichten Mikroplatten mit 384, 864, 1536 oder noch mehr Töpfchen) spielt eine zunehmend wichtige Rolle, wobei der Genauigkeit
- 15 des abgegebenen Probenvolumens grosse Bedeutung zukommt. Die Erhöhung der Probenzahl bedingt meistens auch eine Versuchsminiaturisierung, so dass die Verwendung eines Pipettierautomaten unumgänglich wird und spezielle Anforderungen an die Genauigkeit von Probenvolumen sowie die Zielsicherheit der
- 20 Bewegungsführung bzw. des Dispenses dieses Pipettierautomaten gestellt werden müssen.

- Wegwerfspitzen reduzieren wesentlich die Gefahr eines ungewollten Übertragens von Probenteilen (Kontamination). Be-
- 25 kannt sind einfache Wegwerfspitzen (sogenannte "Air-Displacement Tips"), deren Geometrie und Material für das genaue Aufnehmen und/oder Abgeben von sehr kleinen Volumina optimiert ist. Die Verwendung von sogenannten "Positive-Displacement Tips", welche an ihrer Innenseite einen Pump-
- 30 kolben aufweisen, ist ebenfalls bekannt.

- Zum Automatisieren müssen zwei Vorgänge voneinander unterschieden werden: Die definierte Aufnahme (Aspiration) und die anschliessende Abgabe (Dispensierung) von Flüssigkeits-
- 35 proben. Zwischen diesen Vorgängen wird üblicherweise die Pipettenspitze vom Experimentator oder einem Automaten be-



wegt, so dass der Aufnahmeort einer Flüssigkeitsprobe von deren Abgabeort verschieden ist. Für die Genauigkeit einer Abgabe bzw. Aufnahme/Abgabe ist nur das Flüssigkeitssystem wesentlich, welches aus Pumpe (z.B. ein als Spritzenpumpe ausgebildeter Diluter), Flüssigkeitsleitung und Endstück (Pipettenspitze) besteht.

- Die Richtigkeit (ACC = Accuracy) und Reproduzierbarkeit (CV = Coefficient of Variation) der Abgabe bzw. Aufnahme/Abgabe einer Flüssigkeitsprobe kann durch verschiedenste Parameter beeinflusst werden. Die Geschwindigkeit der Dispensierung bestimmt z.B. weitgehend die Art des Abreissens des Tropfens von der Pipettenspitze.
- 15 Beim Pipettieren werden zwei grundsätzliche Modi unterschieden: Single Pipetting und Multi Pipetting. Beim Single Pipetting Modus wird eine Flüssigkeitsprobe aspiriert und an einem anderen Ort dispensiert. Beim Multi Pipetting Modus wird einmal ein grösseres Flüssigkeitsvolumen aspiriert und
- 20 anschliessend in mehreren - meist äquivalenten - Portionen (Aliquots) an einem oder mehreren verschiedenen Orten z.B. in verschiedene Aufnahmetöpfchen einer Standard-Mikrotiterplatte™ dispensiert.
- 25 Das Messen des aktuellen Volumens einer Flüssigkeitsprobe nimmt aber keine Rücksicht auf die Art und Weise, wie ein Tropfen abgetrennt wurde: In Europa liegt die Norm ISO/DIS 8655-1 der International Organization for Standardization (ISO) mit Sitz in Genf, Schweiz, zumindest im Entwurf seit
- 30 1990 vor. Diese Norm definiert die Rahmenbedingungen zum Durchführen von Laborarbeiten mit Dispensiervorrichtungen, wie Pipetten, Dispensern und Büretten. Bekannte nationale Normen, wie ASTM (USA), British Standard (GB) oder der neueste Entwurf DIN 12650 (Deutschland) müssen sich in das Netz
- 35 der ISO-Norm ISO/DIS 8655-1 einfügen.

Die Norm DIN 12650 unterscheidet in ihrem 4. Entwurf von 1996 im wesentlichen zwei Verfahrenskategorien zum Testen der Messgenauigkeit von Dispensern. Es sind dies gravimetrische und nicht-gravimetrische Methoden. Weil nicht jedes Labor über genügend ruhige Wägestationen und über teure Waagen mit der nötigen Auflösung (sechs Dezimalstellen) zum Durchführen von gravimetrischen Messungen verfügt, werden von der Industrie (z.B. Firma EPPENDORF AG, Barkhausenweg 1, D-22339 Hamburg, Deutschland) fotometrische Tests für Handpipetten, z.B. für den Bereich der Probenvolumina von 0.2 bis 1 µl angeboten.

Eine weitere Methode ist aus dem Aufsatz "Performance Verification of Small Volume Mechanical Action Pipettes" von Richard H. Curtis [Cal. Lab, May/June 1996] bekannt. Im Bewusstsein der Schwierigkeiten (z.B. Verdampfung, Vibrationen, statische Aufladung der Proben) der Anwendung von gravimetrischen Methoden auf eine Flüssigkeitsprobe im Mikroliter-Bereich wird dort ein integriertes System vorgeschlagen, welches auf der Verwendung von colorimetrischen Substanzen beruht. Allerdings muss vorausgesetzt werden, dass die Konzentration einer Indikatorsubstanz, deren optische Dichte gemessen werden soll, genau bekannt ist. Diese optische Dichte im englischen Sprachgebrauch als "Optical Density" (OD) bezeichnete Grösse errechnet sich aus  $\log_{10}(1/T)$ , wobei T als Transmissionsgrad (engl. "Transmittance") bezeichnet wird. Diese Transmission entspricht  $1/I_0$ , d.h. dem Verhältnis von Ausgangsintensität und Eingangsintensität von die Probe durchdringenden Lichtstrahlen. Des Weiteren muss das Gerät zur Messung der optischen Dichte ebenfalls den internationalen Normen genügen. Ausserdem müssen Probleme, wie eine Abhängigkeit der Messung von der Probentemperatur, Veränderungserscheinungen in der Testlösung und Abnützungserscheinungen in der Messküvette in Betracht gezogen werden. Die Firma ARTEL Inc. 25 Bradley Drive Westbrook, Maine, USA, produziert dieses "Artel PCS™ Pipette Calibration System"

genannte, gattungsgemässe System. Es besteht im wesentlichen aus einem vorabgefüllten, verschlossenen Testglas mit 4.75 ml einer genau definierten Konzentration einer Kupferchlorid-Lösung und einem Instrument zum Messen der optischen Absorption ( $A = \text{optische Absorption} = I_0/I = 1/T$ ) dieser Lösung bei einer Wellenlänge von 730 nm. Das Testglas wird in das Instrument eingesetzt und bleibt dort während des ganzen Kalibrationsverfahrens. Der Experimentator öffnet den Deckel des Testglases und gibt mit der zu kontrollierenden Pipette eine der gewünschten Messgenauigkeit entsprechende Probe in das Testglas, worauf er den Deckel wieder verschliesst. Die zugegebene Probe ist eine Lösung von "Ponceau S", einer organischen Testsubstanz, welche unter anderem wegen ihrer Langzeitstabilität und guten "Pipettierbarkeit" (ähnlich wie Wasser, selbst in hohen Konzentrationen) und ihres breiten, gut definierten Absorptions-Peaks bei 520 nm ausgewählt wurde. Die Absorptionspeaks der Kupferchlorid-Lösung und der Testlösung "Ponceau S" überlappen sich nicht. Die Testlösung enthält zudem Biozide, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern sowie einen pH-stabilisierenden Puffer. Das Gerät mischt die beiden Lösungen mit einem eingebauten Mischer und bestimmt die Absorption bei 520 nm (Ponceau S) und bei 730 nm (Kupferchlorid). Auf der Basis dieser beiden Messwerte und den bekannten Ausgangskonzentrationen wird dann das Volumen der zugegebenen Probe errechnet. Obwohl dieses System den Vorteil hat, dass die Messung der optischen Absorption unabhängig von der Weglänge und von Unregelmässigkeiten im Testglas ermöglicht wird, so hat es doch den Nachteil, dass es nicht mit einem sinnvollen Aufwand für die Anwendung in einem Mehrkanal-Pipettier-Automaten adaptiert werden kann.

Ein weiteres gattungsgemässes Kalibrierverfahren verwendet als Testsubstanz "Orange G", das eine Absorptions-Messung mit hoher Empfindlichkeit erlaubt. Nachteilig ist aber hier, dass die flachen Moleküle dieser Testsubstanz eine hohe Ad-

häsion an die Innenwände der Pipettenspitze bzw. an den "Tubings" (Schläuchen), "Troughs" (Tröge bzw. Behälter aus denen aspiriert wird) und/oder Flüssigkeitstöpfchen von Mikroplatten aufweisen. Dadurch findet eine unkontrollierbare Reduktion der Orange G - Konzentration in der Testflüssigkeit statt, was die Zuverlässigkeit des Tests in Frage stellt.

Ein ebenfalls gattungsgemässes Verfahren ist aus BE 761 537 bekannt, welches die automatische Analyse von verschiedenen Substanzen mit erhöhter Genauigkeit, insbesondere die automatische Analyse, welche vom Probenvolumen der Substanz abhängt, offenbart. Gemäss dieser Erfindung mischt man Chrom in der Form von  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  als Indikator in eine Probe, um darin eine bestimmte Konzentration von Chrom(III) zu erhalten. Anhand der gemessenen Chrom(III)-Konzentration wird das effektive Volumen der Probe berechnet. Die Probenvolumina bewegen sich im Milliliter-Bereich.

$\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  liegt in wässriger Lösung als  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  vor. Der Aquakomplex  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  weist gemäss Literatur (siehe Walter Schneider in "Einführung in die Koordinationschemie", Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1968, Seiten 115-117) einen molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von nur ca. 13 auf, wobei ein  $\epsilon$  von weniger als 100 als kleiner bis mittlerer Wert gilt. Bei reinen Aquakomplexen beträgt der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  etwa 50. Die Konzentration eines Farbstoffes und die optische Absorption sind über das Lambert-Beer'sche-Gesetz ( $A = c \cdot \epsilon \cdot l$ ) verknüpft.

Dabei gelten:  $A$  = optische Absorption

$c$  = Konzentration des gelösten Stoffes  
[M = Mol/L]

$\epsilon$  = Molarer Extinktionskoeffizient des gelösten Stoffes [ $1/(\text{M} \cdot \text{cm})$ ]

$l$  = Schichtdicke (der Flüssigkeit, die das Licht durchlaufen muss) [cm].

Aus gerätetechnischen Gründen empfiehlt sich (vgl. Bruno Lange et al. in "Photometrische Analyse", VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1987, Seite 21), nur im Absorptionsbereich von 0.1 bis 1 zu messen. Je höher das  $\epsilon$  ist, um so empfindlicher kann das Messsystem ausgestaltet werden. Um ein Volumen von 1  $\mu$ l in einem Endvolumen von 200  $\mu$ l mit einer optischen Absorption von 0.1 messen zu können, müsste die Konzentration von  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  gemäss dem Lambert-Beer'schen Gesetz in der Probe mindestens 15 Mol/L betragen. Durch diese hohe Konzentration werden aber die physikalischen Eigenschaften der Probe bedeutend verändert, was selbstverständlich unerwünscht ist.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein alternatives Verfahren sowie eine entsprechende Vorrichtung zur Bestimmung des Volumens einer Probe einer Flüssigkeit vorzuschlagen, welches die Unzulänglichkeiten aus dem Stand der Technik beseitigt und eine Kalibrierung auch im Submikroliter-Bereich ermöglicht.

Diese Aufgabe in Bezug auf das Verfahren wird mit den Merkmalen des unabhängigen Anspruchs 1 gelöst. In Bezug auf die Vorrichtung wird die Aufgabe mit den Merkmalen des unabhängigen Anspruchs 15 gelöst. Zusätzliche bzw. weiterbildende Merkmale ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die gemäss der vorliegenden Erfindung verwendeten Metallkomplex-Farbstoffe weisen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von über 10'000 auf, was - gegenüber dem Stand der Technik - den Einsatz von wesentlich empfindlicheren Messsystemen erlaubt: So weisen der Eisen-tris-Bathophenanthrolin-disulfonsäuredinatrium-Komplex  $[\text{Fe}(\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2)_3]^{4-}$  ein  $\epsilon$  von ca. 18'700 (bei 532 nm), der Eisen-tris-Ferrozine-Komplex  $[\text{Fe}(\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2)_3]^{4-}$  ein  $\epsilon$  von ca. 22'000 (bei 560 nm), der

Kupfer-Chromazurol S-Komplex  $[\text{Cu}(\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{O}_9\text{S})^-]$  ein  $\epsilon$  von ca. 16'000 (bei 522 nm) und der Kupfer-bis-Bathophenantrolin-disulfonsäuredinatrium-Komplex  $[\text{Cu}(\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2)_2]^{3-}$  ein  $\epsilon$  von ca. 13'800 (bei 481 nm) auf.

5

Aus dem Stand der Technik bekannte, intensiv farbige organische Farbstoffe sind prinzipienbedingt (meist grosse konjugierte  $\pi$ -Systeme) planar (z.B. Orange G). Durch diese Planarität weisen sie eine nachteilige, durch die Van der Waals-Kräfte bedingte, hohe Affinität zu apolaren Oberflächen wie den Innenwänden der Pipettenspitze, des Tüblings oder der Aufnahmetöpfchen auf.

Ein Beispiel eines Moleküls aus dem Stand der Technik ist in Fig. 1 und zwei Beispiele von zur Verwendung im erfindungsgemässen Verfahren zur Bestimmung des Volumens einer Probe einer Flüssigkeit vorgeschlagenen Metall-Komplexfarbstoffen sind in den Figuren 2 und 3 dargestellt. Dabei zeigen:

20 Fig. 1 Orange G

Fig. 1a Strukturformel

Fig. 1b Draufsicht, raumfüllend

Fig. 1c Seitenansicht, raumfüllend

25 Fig. 2 Kupfer(I)-bis(Bathophenantrolin-disulfonsäuredinatrium)-Komplex

Fig. 2a Strukturformel

Fig. 2b Ansicht raumfüllend

30 Fig. 3 Eisen(II)-tris(Ferrozin)-Komplex

Fig. 3a Strukturformel

Fig. 3b Ansicht raumfüllend

Erfindungsgemäss vorgeschlagene Metall-Komplexfarbstoffe

35 weisen (im Gegensatz z.B. zum organischen Farbstoff Orange G) eine dreidimensionale, z.B. tetraedrische oder oktaedri-

sche Koordinationsgeometrie auf, was aus sterischen Gründen eine Adsorption solcher Moleküle an apolaren Oberflächen massiv behindert. Zusätzlich können die Liganden mit ionischen Gruppen wie Sulfon- oder Carboxyl-Gruppen substituiert werden, was die hydrophilen bzw. die lipophoben Eigenschaften weiter verstärkt. Indikator-Ionen in wässrigen Systemen sind wegen ihrer Ladung und der kugelförmigen Hydrathülle sehr hydrophil und neigen daher ebenfalls nicht zur Adsorption an apolare Oberflächen.

Adsorptionstests mit verschiedenen erfindungsgemäss vorgeschlagenen Komplexen haben gezeigt, dass keine signifikante Adsorption an den Wandungen der Pipettiernadeln oder Tubings stattfindet.

Es ist erwünscht, dass bei dem Messverfahren die pipettier-relevanten Flüssigkeitseigenschaften möglichst wenig verändert werden. Die Zugabe eines Indikator-Salzes in die Pipettierlösung, welches im Aufnahmetöpfchen einer Mikroplatte mit einem chromogenen Liganden reagiert, beeinflusst die Flüssigkeitseigenschaften auf Grund der guten Löslichkeit nur geringfügig. Die Beeinflussung der physikalischen Eigenschaften wird zusätzlich vermindert, indem es Dank des hohen Extinktionskoeffizienten des entstandenen Komplexes möglich wird, nur geringe Ausgangskonzentrationen des Indikator-Salzes einzusetzen.

In den Aufnahmetöpfchen muss eine zumindest stöchiometrische Menge des chromogenen Liganden vor oder nach dem Pipettieren der Indikator-Salz-Lösung vorliegen. Zur sicheren und schnellen quantitativen Reaktion kann auch ein Überschuss an Liganden eingesetzt werden. Allfällige Puffersalze oder redoxaktive Substanzen, die das Indikator-Ion in eine geeignete Oxidationsstufe überführen, liegen ebenfalls in den Aufnahmetöpfchen vor. Der eigentliche Pipettiervorgang wird da-

durch aber in keiner Weise beeinflusst, wodurch dieses Messsystem sehr variabel wird.

Die meisten Farbstoffe sind von ihrer Löslichkeit her jeweils nur für einen bestimmten Bereich von Lösungsmitteln geeignet. Durch das Komplexieren des Indikator-Ions mit einem geeigneten Hilfsliganden kann das Indikator-Ion in jedem beliebigen Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch in geeigneter Konzentration in Lösung gebracht werden. Zum Beispiel können Eisen(III)-Ionen mit 2,4-Pentandion als  $[\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3]$ -Komplex in unpolareneren Lösungsmitteln gut in Lösung gebracht werden. Von 2,4-Pentandion ist eine breite Palette von Derivaten zugänglich, über die die Löslichkeit des Eisenkomplexes in beliebigen Lösungsmitteln eingestellt werden kann. Im Aufnahmegefäß wird ein Hilfsligand entweder durch einen stärkeren chromogenen Liganden quantitativ verdrängt und/oder das komplexierte Indikator-Ion wird durch eine Redoxreaktion in eine Oxidationsstufe überführt, welche die quantitative Bildung eines stärkeren Komplexes mit dem chromogenen Liganden erlaubt. Es ist darauf zu achten, dass das Absorptionsspektrum des Hilfsliganden nicht mit demjenigen des chromophoren Komplexes überlappt.

ELISA-Tests (ELISA = Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) (vgl. "PSCHYREMBEL Klinisches Wörterbuch" Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin 1999, 258. Auflage) sind aus der heutigen Klinischen Diagnostik und Life Science Forschung nicht mehr wegzudenken. Diese Tests erfordern häufig einen oder mehrere Waschschritte im Verlauf eines Tests (vgl. Lubert Stryer in "BIOCHEMISTRY", Freeman and Company, New York 1988, 3<sup>rd</sup> Edition, Page 63). In der Praxis wird die Reaktionsflüssigkeit aus den beschichteten Mikroplatten abgesaugt. Daraufhin werden Pufferlösungen oder Testreagentien in die Aufnahmegefäße dispensiert. Diese beiden Funktionen werden von einem Mikroplatten-Wascher übernommen. Im ersten Schritt agiert das Gerät als Absauger, im zweiten Schritt



wird das Gerät als Dispenser verwendet. Neuere auf dem Markt erhältliche Geräte (wie z. Bsp. von TECAN Austria, Unterbergstrasse 1a, 5082 Groedig, Österreich) können mehrere verschiedene Pufferlösungen, welche einzeln oder zusammen

5 verwendet werden, dispensieren. Mikroplatten-Wascher müssen - neben den bekannten Kriterien für den Dispens - zusätzliche Spezifikationen in Bezug auf das Restvolumen (z.B. höchstens 2 µl) nach dem Absaugen in einem Aufnahmetöpfchen erfüllen.

10

Mikroplatten bestehen vorzugsweise aus optisch einwandfreien Materialien. Andernfalls sind Blindwertmessungen unumgänglich. Besonders bevorzugt werden Mikroplatten mit flachen Böden und parallelen Wänden verwendet. In Mikroplatten, besonders mit 384 oder mehr Aufnahmetöpfchen, kann auf Grund

15 von Oberflächenspannung und Flüssigkeit/Wandung-Wechselwirkung verstärkte Meniskusbildung auftreten. Wenn die Menisken von Flüssigkeitstöpfchen zu Flüssigkeitstöpfchen unregelmäßig sind, resultieren daraus unterschiedliche Weglängen für

20 die photometrischen Messungen, welche die Reproduzierbarkeit negativ beeinflussen. Es empfiehlt sich daher, Mikroplatten mit Low-Binding Eigenschaften oder anderweitig modifizierten Oberflächen zu verwenden, um die verstärkte Meniskusbildung zu unterdrücken.

25

In einem ersten Ausführungsbeispiel quantitativer Messungen wurde das System "FeSO<sub>4</sub> in wässriger Lösung mit FerroZine®" eingesetzt; "FerroZine®" ist das eingetragene Warenzeichen von Hach Company, P.O. Box 389, Loveland, CO 80539 USA. Die

30 Proben wurden sowohl im Single Pipetting Modus (je 12 Einzelpipettierungen) als auch im Multi Pipetting Modus (12 Aliquote) pipettiert. Es wurden 20, 100, 200 bzw. 1000 Einzeltropfen (Solltropfenvolumen = 500 µl) abgegeben.

35

Für die Eichkurve wurde eine wässrige 0.25 M FeSO<sub>4</sub>-Lösung mit FerroZine® und Ammoniumacetat-Puffer angesetzt. Die entstau-

dene Komplexlösung wurde mit Ascorbinsäure stabilisiert. Aus dieser Stammlösung wurden durch Verdünnen Messlösungen hergestellt, die Pipettier volumina von 2.5 nl, 5.0 nl, 10.0 nl, 20.0 nl, 40.0 nl und 80.0 nl in 200 µl entsprechen. Jeweils 12 Aliquote à 200 µl dieser Messlösungen wurden von Hand in eine Mikroplatte pipettiert und die optische Absorption bzw. die Optical Densities (OD) mit einem Mikroplatten-Photometrie-Reader gemessen. Durch die Messpunkte konnte mittels Linearer Regression die Eichkurve errechnet werden.

10

Für die Volumenbestimmungen wurden jeweils 100 µl einer mit Ammoniumacetat gepufferten 3.25 mM FerroZine®-Lösung mit Ascorbinsäure in den Aufnahmetöpfchen einer Mikroplatte vorgelegt. Darauf wurden 10 nl und 50 nl einer mit Ascorbinsäure stabilisierten 0.25 M FeSO<sub>4</sub>-Lösung mit dem Pipettierautomaten zupipettiert. Die Pipettierungen von 100 nl und 500 nl wurden mit einer mit Ascorbinsäure stabilisierten 0.025 M FeSO<sub>4</sub>-Lösung durchgeführt.

20 Nach dem Pipettiervorgang wurde das Volumen mit demineralisiertem Wasser in den einzelnen Aufnahmetöpfchen auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und die Lösungen in den Mikroplatten durch mechanisches Schütteln gut durchmischt. Die optische Absorption der gefärbten Komplexlösung in den Aufnahmetöpfchen der Mikroplatte wurde darauf in einem Mikroplatten-Photometrie-Reader gemessen und die Volumina anhand der Eichkurve berechnet.

Die mit dem System "FeSO<sub>4</sub> in wässriger Lösung mit FerroZine®" erzielten Resultate sind in den folgenden Tabellen 1 und 2 dargestellt:

35

3281/00

Tabelle 1

Single Pipetting Modus			
Sollvolumen	Durchschnittsvolumina der 12 Einzelpipettierungen	ACC	CV
10 nl	9.7 nl	3.0%	2.9 %
50 nl	48.0 nl	4.0%	1.2 %
100 nl	101.8 nl	1.8%	1.5 %
500 nl	497.5 nl	0.5%	1.5 %

5 Tabelle 2

Multi Pipetting Modus			
Sollvolumen	Durchschnittsvolumina der 12 Aliquote	ACC der Aliquote	CV der Aliquote
10 nl	9.8 nl	2.0%	1.4 %
50 nl	48.1 nl	3.8%	2.5 %
100 nl	99.3 nl	0.7%	4.0 %
500 nl	509.0 nl	1.8%	2.8 %

In einem zweiten Ausführungsbeispiel quantitativer Messungen wurde das System "Eisen-tris(acetylacetonat) in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO) mit FerroZine®" eingesetzt. Die Proben wurden sowohl im Single Pipetting Modus (je 12 Einzelpipettierungen) als auch im Multi Pipetting Modus (12 Aliquote) pipettiert. Es wurden 20, 100, 200 bzw. 1000 Einzeltropfen (Solltropfenvolumen = 400 pl) abgegeben.

Für die Eichkurve wurde eine 0.063 M Eisen-tris(acetylacetonat)-Lösung in reinem DMSO angesetzt. Aus dieser Stammlösung wurden durch Verdünnen mit Ammoniumacetat-Puffer, Ascorbinsäure und FerroZine® Messlösungen hergestellt, die Pipettiervolumina von 2.5 nl, 5.0 nl, 10.0 nl, 20.0 nl, 40.0 nl und 80.0 nl in 200 µl entsprechen. Jeweils 12 Aliquote à 200 µl dieser Messlösungen wurden von Hand in eine Mikroplatte pipettiert und die optische Absorption bzw. die Opti-

cal Densities (OD) mit einem Mikroplatten-Photometrie-Reader gemessen. Durch die Messpunkte konnte mittels Linearer Regression die Eichkurve errechnet werden.

- 5 Für die Volumenbestimmungen wurden jeweils 100 µl einer mit Ammoniumacetat gepufferten 3.25 mM FerroZine®-Lösung mit Ascorbinsäure in den Aufnahmetöpfchen einer Mikroplatte vorgelegt. Darauf wurden 8 nl, 40 nl, 80 nl und 400 nl einer 0.063 M Eisen-tris(acetylacetonat)-Lösung in reinem DMSO mit dem Pipettierautomaten zupipettiert.

- 15 Nach dem Pipettiervorgang wurde das Volumen mit demineralisiertem Wasser in den einzelnen Aufnahmetöpfchen auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und die Lösungen in den Mikroplatten durch mechanisches Schütteln gut durchmischt. Die optische Absorption der gefärbten Komplexlösung in den Aufnahmetöpfchen der Mikroplatte wurde darauf in einem Mikroplatten-Photometrie-Reader gemessen und die Volumina anhand der Eichkurve berechnet.

20

Die mit dem System "Eisen-tris(acetylacetonat) in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO) mit FerroZine®" erzielten Resultate sind in den folgenden Tabellen 3 und 4 dargestellt:

25 Tabelle 3

Single Pipetting Modus			
Sollvolumen	Durchschnittsvolumina der 12 Einzelpipettierungen	ACC	CV
8 nl	8.3 nl	3.8%	1.7%
40 nl	37.8 nl	5.5%	2.6%
80 nl	71.2 nl	11.0%	1.1%
400 nl	356.9 nl	10.8%	1.8%

2301/00

Tabelle 4

Multi Pipetting Modus			
Sollvolumen	Durchschnittsvolumina der 12 Aliquote	ACC der Aliquote	CV der Aliquote
8 nl	8.0 nl	0.0%	1.2%
40 nl	38.1 nl	4.8%	1.0%
80 nl	75.8 nl	5.3%	0.8%
400 nl	377.9 nl	5.5%	1.1%

- 5 Wie diese Beispiele zeigen, wurde die eingangs gestellte Aufgabe gelöst. Tatsächlich erlaubt das erfindungsgemäss vorgeschlagene Verfahren unter Verwendung der erfindungsgemäss vorgeschlagenen Metall-Komplexfarbstoffe sowie einer entsprechenden Vorrichtung die Bestimmung des Volumens einer
- 10 Probe einer Flüssigkeit und eine Kalibrierung im Submikroliter-Bereich.

2281/00

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung des Volumens einer Probe einer  
5 Flüssigkeit (A), bei dem - zum Anfärben der Flüssigkeit  
(A) - eine bestimmte Konzentration eines chromophoren  
Indikators in dieser Flüssigkeit (A) erstellt, eine Pro-  
be von der Flüssigkeit (A) abgetrennt, die optische Ab-  
sorption der abgetrennten Probe gemessen und das Volumen  
10 der abgetrennten Probe durch Korrelation der gemessenen  
optischen Absorption mit der Konzentration des Indika-  
tors in dieser Flüssigkeit (A) bestimmt wird, **dadurch**  
**gekennzeichnet, dass** als Indikator zum Anfärben der  
Flüssigkeit (A) Ionen verwendet werden, welche durch  
15 Komplexierung mit einem spezifischen Liganden die Fär-  
bung der Probe erzeugen.
2. Verfahren - zur Bestimmung des Restvolumens einer von  
einer Flüssigkeit (A) abgetrennten Probe in einer Pro-  
20 benaufnahme, aus der ein Teil der Probe entnommen wird,  
so dass nur noch ein Probenrest in der Probenaufnahme  
zurückbleibt - bei dem - zum Anfärben der Flüssigkeit  
(A) - eine bestimmte Konzentration eines chromophoren  
Indikators in dieser Flüssigkeit (A) erstellt, eine Pro-  
25 be von der Flüssigkeit (A) in die Probenaufnahme abge-  
trennt, ein Diluent zum Probenrest hinzugefügt und die  
optische Absorption des verdünnten Probenrests gemessen  
wird, wobei das Restvolumen durch Korrelation der gemes-  
senen optischen Absorption mit der ursprünglichen Kon-  
30 zentration des Indikators in dieser Flüssigkeit (A) be-  
stimmt wird, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Indikator  
zum Anfärben der Flüssigkeit (A) Ionen verwendet werden,  
welche durch Komplexierung mit einem spezifischen Ligan-  
den die Färbung der Probe erzeugen.

35

0281/00

- 17 -

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** - vor dem Abtrennen einer Probe - der chromophore Indikator mit dem Ligand komplexiert und als farbige Komplex-Lösung der Flüssigkeit (A) zugegeben wird.  
5
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 oder 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** - vor dem Abtrennen einer Probe - ein Ausgleichsvolumen als Teil eines Diluents in einer Probenaufnahme vorgelegt wird.  
10
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** - vor dem Abtrennen einer Probe - ein Indikator-Salz der Flüssigkeit (A) zugegeben, eine Probe der Flüssigkeit (A) in eine vorgelegte Reaktionslösung mit dem chromogenen Liganden abgegeben und dort unter Farbentwicklung komplexiert wird.  
15
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der chromophore Indikator vor dem Zugeben zu der Flüssigkeit (A) und zum Verbessern dessen Löslichkeit in dieser Flüssigkeit (A) mit einem Hilfsliganden komplexiert und der Flüssigkeit (A) zugegeben, eine Probe der Flüssigkeit (A) in eine vorgelegte Reaktionslösung mit dem Liganden abgegeben und dort unter Verdrängung des Hilfsliganden und Farbentwicklung mit dem Liganden komplexiert wird.  
20  
25
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** der chromogene Ligand der vorgelegten Reaktionslösung im Überschuss zur erwarteten Reaktionsmenge beigegeben wird.  
30
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** - nach dem Abtrennen einer Probe in ein Probenaufnahme-Gefäß - ein Ergänzungsvolumen in diese Probenaufnahme zugegeben wird.  
35

2281/00

- 18 -

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Indikator Metall-Ionen, insbesondere  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$  oder  $\text{Cu}^{++}$ , verwendet werden.
- 5 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Indikator nicht quantitativ mit dem chromogenen Liganden komplexierbare Metall-Ionen, insbesondere  $\text{Fe}^{+++}$ , verwendet werden.
- 10 11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die nicht quantitativ mit dem chromogenen Liganden komplexierbaren Metall-Ionen vor dem Komplexieren mit dem Liganden zu komplexierbaren Ionen reduziert oder oxidiert werden.
- 15 12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Reduktionsmittel Hydroxylaminhydrochlorid, Tartrat-Salze, Ascorbinsäure und dergleichen, und dass als Oxidationsmittel Hexacyanoferrat, elementares Brom und dergleichen verwendet werden.
- 20 13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Ligand Polydentate, wie z.B. FerroZine®, Bathophenanthrolin-disulfonsäuredinatrium, Bathocuproin-disulfonsäuredinatrium oder Chromazurol S, verwendet werden.
- 25 14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche 6 bis 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Hilfsligand  $\beta$ -Diketone, wie z.B. Acetylacetonat oder Pentan-2,4-dion-1,5-diol, verwendet werden.



2281/00

15. System zur Durchführung des Verfahrens nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, welches eine Dispensier- und/oder Pipettiervorrichtung, eine Probenaufnahme zum Aufnehmen von abgetrennten Proben, ein Gerät zum Messen der optischen Absorption der Proben in der Probenaufnahme und einen Rechner zum Berechnen des Volumens der abgetrennten Proben umfasst.
16. System nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** es ein Pipettier- und/oder Dispensierautomat mit N Kanälen, wobei N insbesondere 1, 4, 8, 96 oder 384 Kanäle bedeutet, ist.
17. System nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** es ein Waschautomat, insbesondere für Mikroplatten, mit N Kanälen, wobei N insbesondere 8, 12, 16, 96 oder 384 Kanäle bedeutet, ist.
18. System nach Anspruch 15, 16 oder 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenaufnahme als eine Mikroplatte bzw. als ein Array von Töpfchen ausgebildet ist.
19. System nach Anspruch 16 oder 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** es eine Trägerplatte mit den Aussenmassen einer Mikroplatte und eine Einrichtung für die Messung der Temperatur von Mikroplatteninkubatoren umfasst.
20. Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14 und in einem System gemäss einem oder mehrerer der Ansprüche 15 bis 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** es zumindest eine in Konzentration und optischer Absorption definierte Testlösung des chromophoren Indikators umfasst.

21. Testkit nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet, dass** er zusätzlich eine definierte Reaktionslösung mit einem chromogenen Liganden umfasst.
- 5 22. Testkit nach Anspruch 20 oder 21, **dadurch gekennzeichnet, dass** er zudem ein Reduktions- oder Oxidationsmittel umfasst.
- 10 23. Testkit nach einem der Ansprüche 20 bis 22, **dadurch gekennzeichnet, dass** er zudem einen Diluentpuffer und/oder einen Hilfsliganden umfasst.
24. Testkit nach einem der Ansprüche 20 bis 23, **dadurch gekennzeichnet, dass** er zudem Mikroplatten umfasst.
- 15 25. Testkit nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mikroplatten eine ausgewählte Geometrie bzw. eine ausgewählte Oberflächeneigenschaft aufweisen.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Vorrichtung und  
5 ein Testkit zur Durchführung dieses Verfahrens zur Bestimmung des Volumens einer Probe einer Flüssigkeit (A). Bei dem Verfahren wird - zum Anfärben der Flüssigkeit (A) - eine bestimmte Konzentration eines chromophoren Indikators in dieser Flüssigkeit (A) erstellt, eine Probe von der Flüssigkeit  
10 (A) abgetrennt, die optische Absorption der abgetrennten Probe gemessen und das Volumen der abgetrennten Probe durch Korrelation der gemessenen optischen Absorption mit der Konzentration des Indikators in dieser Flüssigkeit (A) bestimmt. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass als  
15 Indikator zum Anfärben der Flüssigkeit (A) Ionen verwendet werden, welche durch Komplexierung mit einem spezifischen Liganden die Färbung der Probe erzeugen.

20

(Fig. 2a)

Fig. 1a

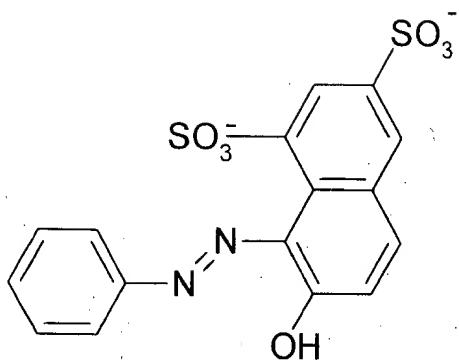


Fig. 1b

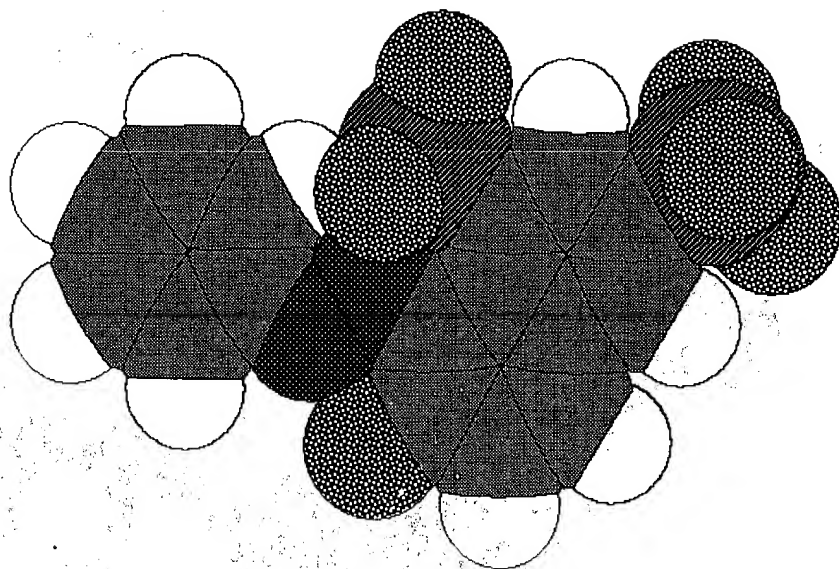
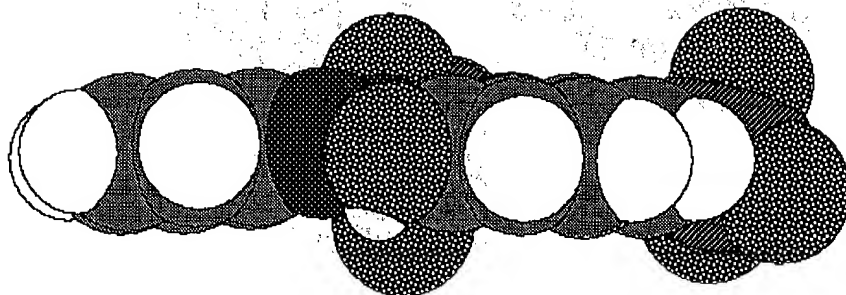


Fig 1c



998100

Fig. 2a

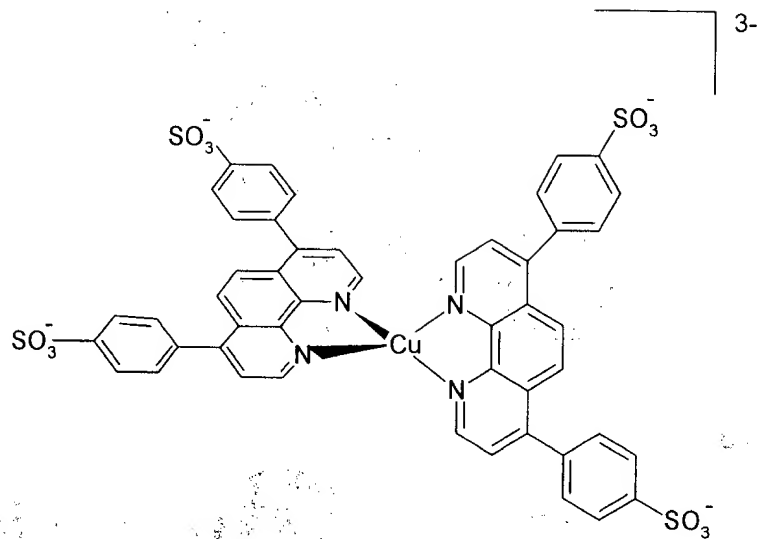


Fig. 2b

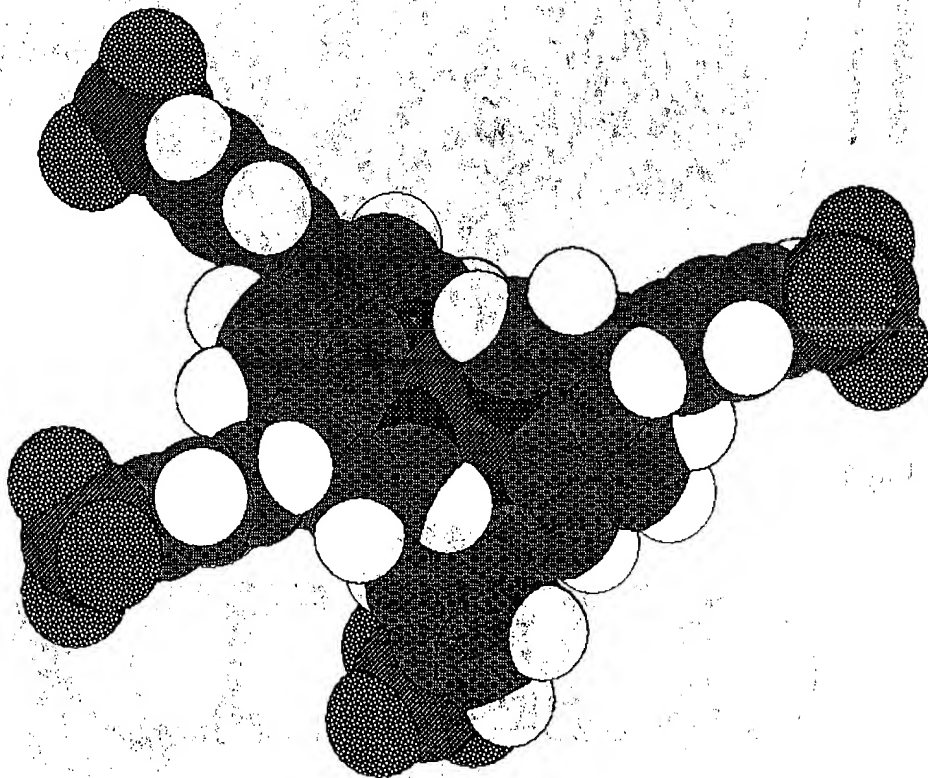


Fig. 3a

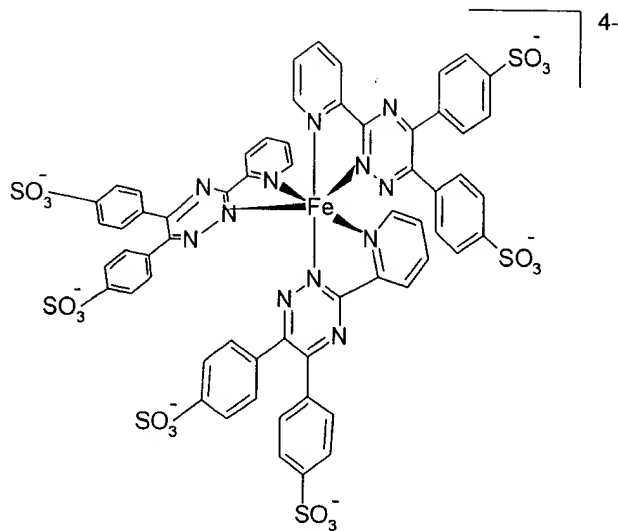


Fig. 3b

